

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-510200

(43) 公表日 平成9年(1997)10月14日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 0 7 K 1/22		9356-4H	C 0 7 K 1/22	
	1/34	9356-4H		1/34
	17/14	9356-4H		17/14
C 1 2 P 21/00		9637-4B	C 1 2 P 21/00	B
G 0 1 N 33/48		0276-2J	G 0 1 N 33/48	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 38 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-523457
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995)2月2日
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)9月10日
 (86) 国際出願番号 PCT/US95/01593
 (87) 国際公開番号 WO95/24418
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)9月14日
 (31) 優先権主張番号 08/209,700
 (32) 優先日 1994年3月10日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), JP

(71) 出願人 ミネソタ マイニング アンド マニュファクチャリング カンパニー
 アメリカ合衆国, ミネソタ 55133-3427, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 33427, スリーエム センター (番地なし)
 (72) 発明者 ヘイルマン, スティーブン エム.
 アメリカ合衆国, ミネソタ 55133-3427, セント ポール, ポスト オフィス ボックス 33427 (番地なし)
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体高分子の単離及び精製方法

(57) 【要約】

本発明は生体高分子を分離する方法であって、複合ろ過媒体（該複合ろ過媒体はその上流表面上に不溶性の固定相微粒子が位置しているろ過層を含み、該微粒子は生体高分子または生体高分子に結合可能である）を含むフィルター要素、溶質として少なくとも1つの生体高分子を含む溶液混合物を含有する貯槽並びにポンプ及び閉鎖ループ組立体を形成するための関連する配管を包含する分離系を供給する段階、及び生体高分子-固定相微粒子生成物を生成するために、少なくとも1つの生体高分子を固定相微粒子に結合させるように、該溶液混合物をフィルターカートリッジにポンプで繰返し循環させる段階を含む方法を提供する。生体高分子を遊離させるために、溶離溶液を生体高分子-固定相微粒子生成物結合相互作用を逆行可能な閉鎖ループ組立体にポンプで流すことができる。

【特許請求の範囲】

1. 生体高分子を分離する方法であって、
 - a) 生体高分子と結合可能な固定相微粒子がその上流表面上に位置している複合ろ過媒体、溶質として少くとも1つの生体高分子を含む溶液混合物を含有する貯槽並びにポンプ及び閉鎖ループ組立体を形成するための関連する配管を含む閉鎖型フィルターカートリッジを含有してなる分離系を供給する段階、
 - b) 生体高分子ー固定相微粒子生成物を形成させるために、前記少くとも1つの生体高分子が固定相微粒子と結合するように、該溶液混合物をフィルターカートリッジにポンプで繰返し循環させる段階、
 - c) 任意に、生体高分子ー固定相微粒子生成物を液体で洗浄して、固定相微粒子に結合していない、所望しない生体高分子及び他の溶質を除去する段階、及び
 - d) 任意に、生体高分子を逆離させるために、溶離溶液を生体高分子ー固定相微粒子生成物結合相互作用を逆行可能な閉鎖ループ組立体にポンプで流す段階、を含んでなる前記方法。
2. 前記固定相微粒子が吸着、イオン交換、疎水的結合及び親和性結合による結合可能な微粒子の群から選択される請求項 1 に記載の方法。
3. 前記溶液混合物を少くとも0.01cm³/分の流動速度、最大0.25MPa のフィルターカートリッジ圧で、フィルターカートリッジにポンプで流す、請求項 1 または 2 に記載の方法。
4. 前記生体高分子が、タンパク質、炭水化物、脂質、及び核酸よりなる群から選択される請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。
5. 前記複合ろ過媒体が、織物または不織布の多孔性物質である請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。
6. 前記ろ過媒体物質が、セルロース、ガラス、ポリオレフィン、ポリエステル、ポリアミド及びセラミックからなる群から選択される請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。
7. 前記ろ過媒体物質がポリプロピレンである請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に

記載の方法。

8. 前記吸着固定相微粒子が、ヒドロキシアパタイト、アルミナ、シリカゲル及びジルコニアからなる群から選択される請求項 2 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。
9. 前記微粒子がアフィニティークロマトグラフィー固定相微粒子である請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。
10. 前記生体高分子を含有する溶液混合物が、発酵培地、細胞溶解物及び体液からなる群から選択される請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。
11. 請求項 1 ～ 10 項のいずれか 1 項に記載の方法により供給される、生体高分子ー微粒子生成物。

【発明の詳細な説明】

生体高分子の単離及び精製方法

発明の属する分野

本発明は、1またはそれよりも多い生体高分子を含む溶液からの、特に大規模での生体高分子の分離及び精製方法に関する。精製された生体高分子は治療剤または診断剤として有用である。

発明の背景

生体高分子は、生きている細胞の構成物または生成物であって、タンパク質、炭水化物、脂質及び核酸を含有する。これらの物質の検出及び定量並びに単離及び精製は長い間研究者の目的であった。検出及び定量は診断上、たとえば、病気のようないくつかの生理学的状態の指標として重要である。生体高分子の単離及び精製は、治療的目的、たとえば、特定の生体高分子が欠乏している患者に投与する時、ある薬品の生物適合性の担体として用いる時及び生物医学的研究に重要である。生体高分子、たとえば化学反応を触媒することができるといわれるタンパク質である酵素も産業上有用である。酵素は単離され、精製され、次いで、甘味料、抗生物質並びに種々の有機化合物、たとえば、エタノール、酢酸、リシン、アスパルチン酸及び生物学上有用な生成物、たとえば抗体及びステロイドの生産のために用いられる。

それらの本来の状態、インピボでは、これらの生体高分子の構造及び対応する生物活性は、通常かなり狭い範囲内のpH及びイオン強度に維持される。どのような分離及び精製操作も、その結果として生じた、処理された生体高分子が機能を失うように、このような因

子を考慮に入れなければならない。

クロマトグラフィーは、しばしば生物学的生成物混合物に実施される分離及び精製操作である。それは、移動相（気体または液体であり得る）と固定相との間の溶質の交換に基づく技術である。溶液混合物の種々の溶質の分離は、各溶質と固定相との結合相互作用が変化するので達成される。すなわち、移動相の結合の分離（de-binding）作用を受けた時、より強い結合相互作用は、それより弱く相

相互作用する溶質に比較して、一般により長い保有時間をもち、このようにして分離及び精製を成しとげることができる。

多孔性繊維マトリックス内に取り込むことにより、生体高分子を分離するための固定相として多分散系の粒子を利用する努力の成果が、米国特許第4,384,957号及び第4,488,969号に開示されている。結果として生じる複合シート構造物を円形に切断し、積み重ねてカラムを形成する。

液体カートリッジフィルターは、何年も進歩してきており、それは、液状の流れと固体マトリックスの相互作用についての非常に効率的な型の代表である。さらに、これらのフィルターは相対的に高い流量、すなわち1/分で、相対的に低圧で作動する。

接線流れまたは放射状の膜カートリッドフィルターにおいては、フィルター要素は液体の流れに平行な面に存在し、2つの流出物または浸透物を生じ、一方はフィルター要素を通ってろ過または処理され、他方はそうでない。

これらのフィルター装置が低圧で作動し、処理されない浸透物は理論的には再利用できる一方、これらの系は本質的にもっと複雑で、フィルター要素を通ずる流れが相対的に少いので、液体の流出を完全に処理するのが遅くなる。また、生体高分子を保持するように、フィルター要素をいくらか変更したとすれば、1回のフィルター

一要素の通過において、完全な保持が必要となるだろう。

「閉鎖型」フィルターでは、フィルター要素は液体流の流れの方向に直角に向けられる。すべての液体流がフィルター要素を通過することが必要であり、唯一の浸透物が生じる。分離が固定相上で、またはフィルター要素内での相互作用により生ずる分離ユニットと考えると、閉鎖型のカートリッジフィルターは非常に巾が広いカラムと類似するだろう。高流量では、生体高分子の1回通過の保持は相対的に低いが、流出液の循環を繰返すことにより、高パーセントの生体高分子を保持することができる。

生体分離(bioseparation)は変更したフィルターカートリッジを用いて行なわれてきた。米国特許第5,155,144号は、重合媒体中に分散された、修飾された

多糖類、たとえばジェエチルアミノエチルセルロースの微粒子、すなわち代表的なイオン交換クロマトグラフィーの固定相を含んだ多孔性シートを開示する。これらのシートをさらに閉鎖型のフィルターカートリッジに配置することができ、ことも示唆されている。流出液の繰返し循環を用いて、鉛イオンで処理された樹脂を2つのステンレスチールの格子の浅いカラムとしてD-キロースの分析的分離について評価した(A. M. Wilhelm及びJ. P. Riba「J. Chromatog.」484, p. 211 ~ 223, 1989)。生じた充填床反応装置系を、相対的に高い系の圧力と低流量での液体クロマトグラフィーの生成について、カラムにおける最終の利用のために、粒子のための流体力学的条件を決定するのに評価した。

米国特許第4,774,004号は、本質的にイオン交換媒体として機能する層状にした珪酸であるろ過酸及び任意に珪土及び活性炭を「装填した」カートリッジフィルターを開示する。結果として生じる構造はドライクリーニング溶媒から界面活性剤及び「溶解された汚物」を除去するのに有用であった。装填の手順、用いられるろ過酸

の量、循環処理流量及び操作系の圧力の詳細は不十分である。1つまたはそれよりも多い生体高分子の分離は行なわれても、考慮もされていなかった。

発明の概要

簡単に言うと、本発明は生体高分子を分離する（精製を包含し得る）方法であって、(a) 生体高分子と結合可能な固定相粒子が、その上流表面に位置している複合フィルター、少くとも1つの生体高分子を溶質として含む溶液を含有する貯槽並びにポンプ及び閉鎖ループ組立体を形成するための関連する配管を含んだ閉鎖型のフィルターカートリッジを含有する分離系を供給する段階、(b) 固定相微粒子に生体高分子が関連する場合は生体高分子-固定相微粒子生成物を生成するように、該溶液を1つの生体高分子または1よりも多い生体高分子と選択的に結合するようにフィルターカートリッジにポンプで繰返し循環させる段階及び(c) 任意に、生体高分子を遊離させるために溶離溶液を生体高分子-固定相微粒子生成物相互作用を逆行可能な閉鎖ループ組立体にポンプで流す段階を含むのである。

この方法で用いるために、本発明は複合ろ過媒体を含むフィルター要素を提供し、該複合フィルター要素は、その上流表面上に不溶性の固定相微粒子が位置しているろ過層を含み、該粒子は生体高分子と結合可能である。

他の面では、上述のフィルター要素を含むフィルターカートリッジを供給する。

さらに他の面では、フィルターカートリッジ及びフィルターカートリッジハウジングを含んだ分離ろ過組立体を提供し、本発明の複合ろ過媒体の固定相微粒子は生体高分子と結合可能である。

本発明は、他の生体高分子溶質化合物を含有している溶液から生体高分子溶質を分離、精製または濃縮する方法を提供する。本方法は相対的に低圧で実施され、大規模の生体分離に適当である。

さらに詳細には、本発明の方法は、ポンプと溶液貯槽に接続されている適切なハウジングの中に含有された、複合ろ過媒体を含む液体フィルターカートリッジを提供する。新規な複合ろ過媒体は、液体（通常、水）中の少くとも1つのクロマトグラフィー吸着、イオン交換、親和力及び疎水的固定相微粒子を含むスラリーを、固定相微粒子がろ過層の上流表面上に主として位置するように、ろ過層に部分的に負荷するようにポンプで送る方法によって調製する。次いで、分離される生物学的混合物の溶液を、注目の生物学的溶質が、固定相との結合会合により溶液から分離されるようにフィルターカートリッジにポンプで流す。選択された生体高分子溶質の除去された（またはその濃度が減少した）、生じた溶液を利用し得る。しかしながら、該手順は分離された生物学的溶質を回収するためにより一般的に実施される。溶出または単離段階の間に、固定相への結合を逆行させるのに影響し得る溶液を次いでフィルターカートリッジに、好ましくは生化学的溶液混合物の最初の容積よりも小容積の溶液で、ポンプで送る。フィルター要素を通過する溶液から選択された生体高分子溶質の結合は吸着または化学反応であり得る。好ましい結合メカニズムは吸着、イオン交換、疎水的会合及び親和性結合を包含する。分離段階では、前もって結合した生体高分子を単離及び精製するために該結合を逆行(reverse)し得る。

この出願において、

「生体高分子」は少くとも500 の分子量を有する細胞の成分及び生成物、たとえばタンパク質、炭水化物、脂質または核酸を意味する。

「ろ過層」は、単一シートを提供するように結合し得る1またはそれよりも多い独立した層を含むことができるシート様の織物のまたは不織布の多孔性の物質で、平均孔径は1 ミクロンよりは大きく、50ミクロンまでである物質を意味する。

「複合ろ過媒体」は、その上流表面に位置する固定相微粒子を含むろ過層であって、該媒体は最大で0.25メガパスカル(MPa)のフィルターカートリッジ圧で少くとも0.01cm³/分の流動速度を維持することができることを意味する。

「フィルター要素」は流体の通過のために形成された複合ろ過媒体を意味し、ろ過/分離/精製操作を達成する分離フィルター組立体の事実上の成分である。

「フィルターカートリッジ」は、好ましくは円筒形である、閉鎖型ろ過装置を意味する。

「フィルターカートリッジハウジング」はフィルターカートリッジの支持構造を意味する。

「分離フィルター組立体」は、その上流表面上に固定相微粒子が位置している複合フィルター媒体を含んでなる閉鎖型フィルターカートリッジを含有するハウジングを意味する。

「分離系」は、貯槽、分離フィルター組立体、ポンプ及び関連する配管に含有される少くとも1つの生体高分子を含んでなる溶液混合物を意味する。

「流動速度(flux rate)」はフィルター要素を通過する液体流れの速度を意味し、ろ過層の表面積によって割った流量(flow rate)と等しい。この方法で記載すると、液体流の流れを特徴づけることができ、それはろ過層のサイズと無関係である。流動速度はフィルターをわたる圧力低下の一因にもなる：すなわち、流動速度の増加は一般に系の圧力の増加を意味する。商業的なフィルターカートリ

ッジの用途では、液体流れの最大量を処理する最小のサイズのフィルターを供給

することが非常に望ましい。したがって、流量の増加により流動速度が増加することが望ましい。

「固定相微粒子」は、溶液混合物中の注目の生体高分子成分と結合会合を生成し得る不溶性微粒子を意味する。特定の結合会合は、吸着、イオン交換、疎水性及び親和性相互作用を包含する。

「クリオオプア(cryo-poor)」は凍結/乾燥サイクル後、溶けなかった固体を除去した血漿を意味し、

「不溶性」は23℃で溶媒 100部中に1部より多くの粒子が溶解しないことを意味し、並びに

「フィルターカートリッジ圧」は、分離系におけるフィルターカートリッジを渡る、入口または上流と出口または下流の間の圧力の差を意味する。

本発明の方法は生体高分子の分離に用いられる先行技術のカートリッジフィルターの問題を克服する。フィルター要素内に固定相微粒子を含有する先行の技術は、製造上の課題を示し、限定された能力しか提供しない。空気伝達の微粒子の危険性は良く知られており、フィルター要素内に取り込まれる小さい固定相微粒子を含むフィルターカートリッジの構築において、生じ得る製造上の問題に関する。先行技術の系は、分離される生体高分子の量を増加するために、もっと多くの微粒子をフィルター要素に負荷しなければならぬという能力にも制限を受ける。微粒子の負荷(load)が多いほど、多孔性が減じ、それに伴って操作系の圧力が増加した、フィルター要素を生じさせる。

本発明は先行技術のフィルターのこれらの問題を、乾燥した固定相微粒子を取り扱うことを著しく減らすことにより、そして相対的に低いフィルターカートリッジ圧力での粒子の高負荷能力を提供す

ることにより克服する。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の複合ろ過媒体の断面の図解であり、

図2は、本発明の複合ろ過媒体上の型押し模様の透視図であり、

図3は、本発明の円筒形にひだをとったフィルター要素の透視図であり、

図4は、本発明の円筒形のフィルターカーカトリッジの支持部材の透視図であり

図5は、本発明の分離フィルター組立体の透視図であり、

図6は、本発明の分離系の図解であり、

図7は、比較のタンパク質と本発明の精製されたタンパク質の染色されたタンパク質ゲル電気泳動型を示す。

図面の詳細な説明

図1は、1またはそれよりも多い独立した層であり得る、表面ろ過層11としての好ましい不織布ウエブ、その上流表面に位置している不溶性の固定相微粒子12を含んでなる、複合フィルター要素10の断面の図解である。均一な多孔性と明確に固定された孔を有する不織布ろ過層11は、粗い上流予備ろ過層13、下流になるほどますます細かい孔を有する多数の不織布ろ過層14及び下流の不織布表面層15を含み得る。

図2は、本発明の好ましい態様の例である。これらはフィルターカーカトリッジを製造するのに用いられる複合ろ過媒体20上の型押し形22の模様のひだをとっていない部分の透視図を示す。型押しは前面の表面積を増加させ、フィルター要素の表面をさらに完全に固定するために行なわれる。不溶性の固定相微粒子は、明確にするため

に図から除外されている。

図3は、本発明の好ましい態様の縦に伸長された、円筒形にひだをとったフィルター要素30の透視図であって、本発明の好ましい放射状にひだをとった複合フィルター要素30の放射状のひだ32が示されており、ここでも、明確にするために固定相微粒子は除外されている。

図4は、円筒形のフィルターカーカトリッジ40（本発明の好ましい態様である）の内側及び外側を補足した支持部材を説明する透視図である。外側支持構造41、たとえば多数の孔があるスクリムまたは網は、フィルター要素の破裂の可能性を減少させるために、内から外へ（inward-out）の液体の流れ模式での追加の支持となり得る。同様に、スクリムもしくは網または多孔性ケースもしくは同様の構

造からなる内側支持構造42は、フィルター要素（図示せず）が、好ましい外から内への（outward-in）流れ状況での高圧の適用による破壊を防ぐための支持となり得る。どちらの場合も、補足の支持構造は通常はフィルターカーカトリッジの末端片43に結合して、一体的なユニットとなる。

図5は、本発明の分離フィルター組立体70の透視図であって、これは本発明の好ましい態様である。フィルターハウジング71はフィルターカーカトリッジ（図示せず）を含有する。分離ループでは、入口部72は、好ましい外から内への様式で、フィルターカーカトリッジに溶液混合物を入れることを可能とする。液体は、出口部73を通過して分離フィルターから出る。好ましい組立体では、分離ヘッド74は、フィルターハウジング71に、調節ノブ76で張力を調整しながらねじ付きボルト（図示せず）を用いる機械的クランプ75によって取り付けられている。分離ループでは、入口部77は結合の分離溶液が好ましい外から内様式でフィルターに入るのを可能とし、今や所望の

生体高分子溶液を含有する、結果として生じた溶液は、出口部78を通過して分離フィルター組立体を出る。

図6は本発明の分離系80の図解である。貯槽81は、攪拌器具83によってもたらされる攪拌を伴う、水性固定相微粒子スラリー-82及び/または生体高分子溶液混合物82を含有する。スラリーまたは溶液82は、ポンプ85によって、出口管84から送り出され、分離フィルター組立体86（これは、フィルターカーカトリッジ（図示せず）のろ過層の上流表面に位置する固定相微粒子を含有する）を通過し、入口管87（矢印は液体の流れの方向を示す）を経由して貯槽に戻る。

図7は染色されたポリアミド電気泳動ゲル90を示す。レーンAは、既知のタンパク質（開始点からの増加した移動距離の順に列挙してある。およその分子量（ダルトン）も示されている）の商業的な混合物（Pharmacia LKB Biotechnology、ウブサラ、スエーデンから入手可能）を用いて達成されたタンパク質電気泳動分離パターンを示す：ホスホリラーゼb（94,000）、ウシ血清アルブミン（67,000）、オボアルブミン（43,000）、カルボニックスアンヒドラーゼ（30,000）、大豆トリプシン阻害剤（20,100）及び α -ラクトアルブミン（14,400）。レーンBは

クリオアプアのヒト血漿を含む多数のタンパク質を示す。レーンCは商業的な（Sigma Chemical Co., セントルイス、ミズーリ州）ヒト免疫グロブリンのタンパク質の電気泳動パターンを示し、レーンDは例5のタンパク質流出液のタンパク質電気泳動パターンを示す。

好ましい態様の詳細な説明

本発明はろ過層の上流表面上に生体高分子に結合可能な固定相微粒子を導入するフィルター要素を包含する分離フィルター組立体を含んでなる、生体高分子を単離及び精製する方法を提供する。該分

離フィルター組立体は、上記フィルター要素を包含する液体フィルターカートリッジ及び該フィルター要素を、1つまたは好ましくは2つまたはそれよりも多い生体高分子を含む溶液の貯槽に連結された適当なカートリッジハウジングを含む。フィルターカートリッジ（粒子に結合することにより分離される選択された生体高分子または結合された生体高分子を遊離させる溶離溶媒を包含し得る）を遊離高分子を更に捕獲して分離を完全にするために、または所望により結合された生体高分子を溶離するために、生じる溶液をフィルター要素を繰返し循環させることができるように、溶液をフィルター要素を通り、貯槽に戻るように通過させるポンプに適当な配管により連結する。

より詳細には、本発明は生体高分子の分離または精製方法を提供し、該方法は

1) 複合ろ過媒体、その上流表面に位置する、生体高分子と吸着、イオン交換、疎水性または親和性結合可能な固定相微粒子、1またはそれよりも多い生体高分子溶液を含む溶液混合物を含有する貯槽、ポンプ及び閉鎖ループ系を形成する関連する配管を含んでなる閉鎖フィルターカートリッジを含有する分離系を供給する段階、

2) 固定相微粒子への選択された生体高分子の結合を達成するために該溶液混合物をフィルターカートリッジ組立体にポンプで繰返し循環させる段階、該フィルターカートリッジを通る該ポンプによる循環は最大0.25MPa のフィルターカートリッジ圧力で、少くとも0.01cm³/分、好ましくは少くとも0.10cm³/分、さらに

好ましくは少くとも0.30cm³/分の流動速度で行なわれており、

3) 任意に、生体高分子と固定相微粒子との生成物を適当な溶液で開環または1回通過手順で洗浄して、選択された吸着、イオン交換、疎水性または親和性相互作用により固定相微粒子に結合してい

ない、所望しない生体高分子及び他の溶質を除去し、

4) 任意に、該生体高分子と固定相微粒子結合相互作用を逆行させて、分離及び精製された生体高分子を遊離するだろう、溶質を含有する、好ましくは容積が減少した（最初の溶液混合物の容積に比較して）結合の分離溶液をポンプで送る段階を含んでなる。

先行技術では、液体流のろ過による微粒子の除去は下記のろ過方法の1つまたは組み合せを適用することにより達成され、各方法により用いられる液体フィルターカートリッジは商業的に入手できる。本発明は、流動分離系において、ろ過層が固定相微粒子を保持することによるこれらのフィルターカートリッジの修正したものを利用する。

i) 深部ろ過 (Depth Filtration) ……この手順は微粒子を含有する流れが、大きさで分類された穴または孔の分布を有するフィルター要素と向かい合っているものであり、微粒子にろ過層を通るかなり曲がりくねった通路を提供する。先行技術では、微粒子は主にくろ過層自体の内に吸着及び/または取り込みによって除去された。深部ろ過、すなわち、しばしば系に適用される粗いまたは最初のろ過手順に適用され、数100ミクロン（最大直径で）から約1ミクロンのサイズを有する粒子を除去するように設計されたものは、明確に固定されていない孔のサイズによる微粒子の不完全な除去及びフィルターの一負荷につれて確実に、そして急速に増加するフィルターカートリッジ圧という問題をこうむる。

ii) 表面 (ケーク) ろ過 ……この手順は本発明において好ましく、流体流の処理において、しばしば深部ろ過に続いて起こる。先行技術では、一般に明確に固定された孔のサイズを有するガラスまたはポリマーの微繊維の多層を用いて行なわれ、一般に微粒子はろ過層の内には侵入せず該層の上流表面上に取り込まれて維持された。約

1 ミクロンまでのサイズの微粒子が 99.99% という高効率で回収された。高流動速度をすぐに達成でき、かなり大量の微粒子をフィルタがほとんどいっばいになるまでかなり低い系の圧力で除去した。本発明では、液体流れを何度も逆転することによりろ過層の表面上のろ過された粒子を除去または再整列させるのが有利かもしれない。この機会には深部フィルターではない。

iii) メンブラン (網またはふるい) ろ過…このろ過方法は本質的に0.05ミクロンくらい小さいサイズのすべての粒子を除去し得る明確に固定した非常に小さい孔が存在している以外は、表面ろ過と非常に似ている。その流れに残留している微粒子の「絶対的な」規制をもたすが、このろ過方法は低流量、低能力、高圧及び目詰まりの問題も伴う。

本発明の有用な表面フィルターカーカートリッジは、米国特許第3,058,594 号の標準の縦型のひだをとったフィルタカーを包含し、特に好ましいのは、米国特許第4,842,739 号の水平の放射状のひだをとった複合フィルタカーである。フィルターカーカートリッジは一般に直立して用いられ、流れが中断し、カートリッジが使用の間に貯蔵される時、大部分の%の粒子が水平のひだの内に保持されるという理由で、ひだの水平配置 (図3参照) が本発明では好ましい。他のフィルターカーカートリッジ、たとえば、糸を巻き、樹脂で結合したフィルタカー及び噴霧紡糸深部フィルタカーも用い得るが、一般的に、かなり低い系の圧力を維持する一方で、表面フィルタカーと同じ位の多さの微粒子を受け入れる能力を欠く。

標準の円筒状、直立型のひだをとったフィルターカーカートリッジはアメテック会社 (Amateck Inc. Seboygan, ウィスコンシン州) で、種々のサイズ、たとえば、4.8×24.8cm (直径×高さ)、6.7×24.8cm、6.7×50.8cm、11.4×24.8cm及び11.4×50.8cmで、フィル

ター要素物質、たとえば、セルロース、セルロース-ポリエステル、ガラス-セルロース、ポリエステル、ポリプロピレン及びセラミックを用い、平均の公称の孔サイズ、たとえば1、2、3、5、10、20、30及び50ミクロンを有しているものを入手できる。好ましい円筒状の、全ポリプロピレン製の水平面で放射状にひだをとった複合表面フィルターカーカートリッジを3Mろ過製品 (Filtration Produ

cts、セイントポール、ミネソタ州) で、種々のサイズ、たとえば、6.4×25.0cm、6.4×50.0cm、6.4×75.0cm及び18.0×100.0cmで、平均の公称の孔のサイズが2、5、10及び20ミクロンで購入することができる。より小規模の分離のために有用なより小さい使い捨てカプセルフィルターはゲルマン科学会社 (Gelman Science, Inc. Ann Arbor、ミネソタ州) から、種々のサイズ、たとえば、6.3×6.4cm、5.8×17cm及び8.6×14cmで、フィルター要素物質、たとえば、アクリル被覆ナイロンのようなポリアミド及びポリプロピレンを用い、平均公称孔サイズ、たとえば、1、3及び5ミクロンで、入手できる。結合 (分離段階) 及び分離 (分離段階) 相互作用をフィルターカーカートリッジ製造業者から入手できるフィルターカーカートリッジハウジングを用いて行なうことができるとしても、これらのハウジングは一般に一組の入口及び出口のみを有している。結果として、結合の分離溶液を導入するとき、非常に望ましい濃度の精製された生体高分子を達成するのは困難である。ウルトラフィルタースステム (Ultra Filter Systems、ブルックリンセンター、ミネソタ州) から入手し得る、全ポリプロピレン製の好ましいフィルターカーカートリッジハウジングは、より小さい追加の一組の入口及び出口を有している。このより小さい一組の口は、一般に著しく減少した量の溶液を用いて生体高分子の結合の分離を達成するのに有利に用いることができ、その上、工程中で精製された生体高分子はより

濃縮された溶液で得られる。

好ましくは、本発明のろ過媒体の組成物は、その上流表面上がでたらめに配列した不溶性の固定相微粒子である、1またはそれよりも多い不織層を含む。機械的観点から及び用いられる溶媒に関し、ろ過媒体の組成物は、ほとんどもっぱら水が用いられ、本質的にすべての上記特定のろ過層は、一般に水中でうまく働くという理由で、分離を実施する時、臨界的ではない。好ましい物質は、入手可能性、コスト及び不活性という理由でポリプロピレンである。ろ過層の孔のサイズを選択はその表面に維持される固定相微粒子のサイズ範囲、及び一般に最も小さい粒子サイズに直接に依存する。しかしながら、微粒子の一部のサイズがろ過層の孔のサイズより小さいとしても、有用な複合ろ過媒体を得ることができること

を確認した。

下記参照の部分負荷された媒体を製造する方法のために、これらのより小さい微粒子は初期の循環ではフィルター要素を通過し、後期の循環では微粒子床として蓄積し、該装置は深部フィルターの性質を呈するだろうし、これらの小さい粒子も除去でき、本発明で用い得る。時間効率及び好ましい表面ろ過法でフィルターカートリッジを利用するためには、しかしながら、フィルターの最初の通過により少くとも95%の固定相微粒子が除去される表面フィルターカートリッジを用いるのが好ましい。一般に、公称平均1～10ミクロンと評価されるフィルターカートリッジがこれらの基準に合致し、本発明に用いられる微粒子のための効率的なフィルター要素を供給し、低フィルターカートリッジ圧で相対的に高い流動速度で送達することも可能である。多孔質で非繊維質の膜のような、平均孔サイズが1.0ミクロンより小さいろ過層は、存在し得る偶発的な粒子だけでなく、しばしば高度に濃縮された生物学的溶液混合物において遭遇する懸濁された生物学的物質により目詰まりしそうであるため

、一般に有用ではない。

本発明の目的のために、固定相微粒子は溶液混合物中の注目の生体高分子と次の相互作用、すなわち、吸着、イオン交換、疎水性会合及び親和性結合の1または組み合せにより、結合または強く会合する。本発明で有用な固定相微粒子のサイズは、小部分（たとえば5%より少ない）がサブミクロン（最大直径）である分布から、用いられるフィルターカートリッジの性質に依存して、数ミリという範囲に変化し得る。微粒子のサイズの下限に関する議論及び注意はろ過層の適当な孔サイズを選択に関連して既に示した。微粒子のサイズの上限は、特定の種類のフィルターカートリッジに依存するであろうし、ひだまたは折りたたみの先端の分離によって、結局は決定される。微粒子のサイズは、フィルター要素のひだまたは折りたたみの上流表面内及び上への浸透が起こり得るように、ひだまたは折りたたみの入口片の間の距離よりも小さいことが必要である。実際の作業の問題として、ひだ／折りたたみの先端距離を超えることによる、粒子の凝集を防ぐため、かなり小さい粒子サイズ、すなわち、ひだ／折りたたみの先端距離の約

1/5またはそれより小さいサイズが好ましく用いられることを実験が明らかにした。本発明の重要な特性は、相対的に高表面積を有する微粒子支持体を利用することによって、一般に大量の選択された生体高分子を分離し得ることである。好ましくは該表面積は少くとも $10\text{m}^2/\text{g}$ 、さらに好ましくは少くとも $50\text{m}^2/\text{g}$ 、最も好ましくは少くとも $100\text{m}^2/\text{g}$ で、 $5000\text{m}^2/\text{g}$ までである（気体吸着測定により測定）。固定相物質の粒子サイズは好ましくは直径サブミクロン～400ミクロンの範囲であり、さらに好ましくは1～200ミクロン及び最も好ましくは10～100ミクロンである。

溶質と固定相微粒子との間の種々の相互作用は、相対的に弱い引

力、たとえば双極子-双極子、イオン-双極子及びイオン-イオン相互作用を包含し得る。本発明において少くとも500の分子量を有する生体高分子を効率的に結合させるものは、これらのいくつかの相互作用が生体高分子と固定相との間の相対的に広い面積にわたって生じ、網状の強い引力をもたらすことである。

吸着クロマトグラフィーは、固定相の極性基と生体高分子上の多様な極性基と結合会合(binding association)を利用する。これらの結合会合は一般に双極子-双極子及びイオン-双極子相互作用の形である。精製操作の結合または分離段階は、上述の固定相と生体高分子溶質との間の結合会合が結合に最大限に影響することができるよう、通常は相対的に低イオン強度の水性緩衝液から実施される。低イオン強度の緩衝水溶液を用いる洗浄の後、通常用いられる溶離液は固定相と溶解された塩との間の相互作用が固定相から生体高分子を立ち退かせ、生体高分子を再溶解し、分離系から、より純粋な形で回収され得るように、相対的に大量の、高イオン強度の、溶解された塩及び付随するものを含有する。

好ましい吸着固定相微粒子は、ヒドロキシアパタイト (Bio Rad Laboratories、リッチモンド、カリフォルニア州から入手可能)、アルミナ (EM Separations、キプスタウン、ニュージャージー州から入手可能)、シリカゲル (同様にEM Separationsから入手可能) 及びジルコニア (米国特許第5,015,373号に開示されている) を包含する。

イオン交換クロマトグラフィーは、多くの生体高分子がイオンのに荷電されて

いるという事実を利用する。さらに、これらの多くのイオンの荷電された基、たとえば、プロトン化アミン及びカルボキシレートは中性及び、pHの変化によって非荷電にすることができる。これは、しばしば、電荷中性が存在するまたは構造内の負に荷

電した基の数と隔に荷電した基の数が同じ時のpHである、pIによって示される、それらの等電点に基づく生体高分子のための鋭敏な、非常に強力な技術を提供する。pHがpIより高く維持されるなら、アニオン交換樹脂を生体高分子と結合するのに用い得るし、反対に、pHがpIより低ければ、カチオン交換樹脂が溶液混合物からの生体高分子の結合及び除去に影響し得る。この技術を用いて、生体高分子の近づきやすいまたは表面電荷における小さい差ですら、効果的な分離をもたらすことができる。不溶化された生体高分子と固定相微粒子生成物の洗浄後、イオン交換固定相微粒子からの結合された生体高分子の溶解は、その対応するイオンが固定相微粒子から生体高分子と交換または生体高分子を立ち退かせる、相対的に高濃度の塩溶液を導入することにより一般的に行なわれる。

有用なイオン交換固定相微粒子は、ファルマシア エル ケービー バイオテクノロジー会社 (Pharmacia LKB Biotechnology Inc. ビスカウエイ、ニュージャージー州) イー エム分離 (EM Separations、ギブスタウン、ニュージャージー州) 及びバイオセブラ会社 (Biosepra, Inc. マルボロー、マサチューセッツ州) を含むいくつかの売主から入手できる。有用なアニオン交換樹脂は、ジェチルアミノエチル及び第4アンモニウム基を含有するように修飾されたアガロース、デキストラン及びセルロースポリマーを特徴とする。カチオン交換樹脂は、同じ基体ポリマーであるがカルボキシレート基及びスルホネート基を有することと特徴とする。疎水的相互作用クロマトグラフィーは、「似た物は似たものに溶解する」という原理及び多くの生体高分子の疎水性を利用する。固定相微粒子の疎水性のポケットへの生体高分子の疎水的部分の挿入は溶液混合物からの生体高分子の結合会合及び分離をもたらす。該手順は一般に相対的に高イオン強度の水溶液からの結合により行なわれる。こ

のように、生体高分子は、ほとんど「塩析する」溶液であることによっていくらか不安定な溶解性で開始し、速やかに疎水性の固体支持体に結合するだろう。溶解は一般的に、イオン強度の減少した水溶液 (及び生体高分子のために効率の増加した溶媒) を用いて行なわれる。すなわち、代りに、共溶媒として水と共に50重量%までの量の有機溶媒、たとえばアセトン、アセトニトリル、エタノール、メタノール及びN、N-ジメチルホルムアミドを用いて、固定相微粒子との不溶性複合体から生体高分子を除去する。

有用な疎水的相互作用固定相微粒子は、数ある売主の中でファルマシアから購入でき、アガロースを基体とする支持体を特徴とする。任意の疎水的相互作用固定相微粒子をブチル基、オクチル基及びフェニル基を内蔵させることにより修飾し得る。

アフニティークロマトグラフィーは、固定相微粒子にリガンドまたは生物特異的エフェクターを共有的に結合させることにより一般的に作用する。このリガンドまたはエフェクターは、「錠及び鍵」の関係により生体高分子と相互作用する能力のために選ばれる。たとえばタンパク質を分離したければ、共有的に結合されたリガンドまたはエフェクターは、しばしばタンパク質の活性部位 (「錠」と強く結合する基質または阻害剤 (「鍵」分子) である。この工程の高度の選択性は複合体混合物からの生体高分子の一段階精製を可能とする。溶解はしばしばpHの単純な変化により達成されるが、解離溶液及び技術は各生体分子—リガンドの対に特異的であり、特異的な指示は製造者から得られる。

有用なアフニティークロマトグラフィー固定相微粒子はファルマシア、トソハース (Toso Haas)、EM分離、バイオセブラ会社及び3Mバイオアプリケーションズ (3M Bioapplications、セントポール、ミネソタ州) から入手できる。アガロース、セルロース及び

ビニルポリマーを包含する種々の基体微粒子支持体はたとえばファルマシア (ビスカタウエイ、ニュージャージー州) から入手可能であり、いくつかのリガンド (生体親和性に対応する) を有しており、そのリガンドは、アルギニン及びベンズアミジン (セリンプロテアーゼ)、シバクロンブルー (アデニル含有補因子を

有する酵素、アルブミン、凝固因子、インターフェロン）、カルモジュリン（ATPアーゼ、プロテインキナーゼ、ホスホジエステラーゼ、神経伝達物質）、ゼラチン（フィブリンゲニン）、グルタチオン（S-トランスフェラーゼ、グルタチオン依存性タンパク質、融合タンパク質）、ヘパリン（成長因子、凝固タンパク質、ステロイド受容体、制限エンドヌクレアーゼ、リボタンパク質、リパーゼ）、プロテインA及びG（IgG及びサブクラス）、レーリシン（プラスミノーゲン、プラスミノーゲン活性化因子、リボソームRNA）、プロシオンレッド（NADP⁺依存性酵素、カルボキシペプチダーゼG）、コンカナバリンA及びレクチン（糖タンパク質、膜タンパク質、糖脂質、多糖類）並びにDNA（ポリメラーゼ、T-4ポリヌクレオチド キナーゼ、エキソヌクレアーゼ）を包含する。

フィルターカートリッジ、フィルターハウジング及び固定相微粒子については記載してきたので、分離系を製造する工程は、今や詳細となっているであろう。

該工程は次の段階

i) ハウジング中に含有された本発明の複合ろ過媒体を含んでなるフィルターカートリッジ、液体中の不溶性固定相微粒子のスラリーを含有する貯槽、並びに少くとも0.01cm³/分の流動速度で輸送可能なポンプ及び関連する配管を供給し、ii) 該スラリーを所望の量の固定相微粒子が充填されるまで繰返し循環様式でフィルターカートリッジに、ポンプで流し、好ましくは該フィルターカートリッジ圧は約0.15MPaより小さく、より好ま

しくは0.10MPaより小さく、最も好ましくは0.05MPaより小さく、

iii) 少くとも1つの生体高分子溶液を含む生物学的溶液混合物を、生体高分子の分離をもたらすために分離フィルター組立体中で循環を受けることができるように、貯槽に導入する、段階を包含する。

本発明で有用なポンプは、フィルターカートリッジを通る、0.01cm³/分より大きく、好ましくは0.10cm³/分より大きく、より好ましくは0.30cm³/分より大きく流動速度をもたらす。1よりも多い生体高分子溶液を含む、少くとも1つのスラリー及び溶液混合物が流れる、ポンプ並びに関連するガスケット及び配管/管（

tubing/piping) は好ましくは溶液によって相対的に化学的に影響を受けない。好ましいポンプは、蠕動、ダイヤフラム、ギア及び遠心的に運転されるポンプを含み、溶液と接触する実際のポンプ成分はステンレススチールまたはポリテトラフルオロエチレン（PTFE）で構築される。ゴムまたはプラスチックの配管/管は水性媒体で行なう、充填（packing）及び分離には適当であるが、有機溶媒の水性混合物を用いる場合には、ポリプロピレン、ポリエチレン、PTFE、ステンレスチール及びガラス製の管が好ましく用いられる。フィルターカートリッジとフィルターハウジング及びその他の分離系との連結を境界面で接続するための好ましいガスケット物質はPTFE及びポリプロピレンを包含する。

慣用の「乾燥」充填製造技術に対比して、液体担体を用いることによる、ろ過層上への微粒子の「湿」充填は、微粒子が続いて溶液混合物が近づきやすいフィルター要素の領域に位置することを保証する。液体担体の流れは微粒子の最終的な位置に影響を与え得るけれども、微粒子は、それらの位置が予め選択されていないという意

味で、ろ過層上にために位置する。上記工程によるフィルターカートリッジの充填では、フィルター要素の相対的に均一な部分負荷を達成するために、各充填期間の液体中の微粒子をかなり希釈された濃度で用いることが望ましい。微粒子を貯槽へ小部分づつ添加する風に（もし適当に濃縮されていて、水にぬれるなら溶媒なし、予めスラリー化して）、各部分の間に生ずる貯槽の容量を視覚的に明らかにしながら、添加する。充填操作の流動速度は好ましくは少くとも0.01cm³/分、より好ましくは少くとも0.10cm³/分、最も好ましくは少くとも0.30cm³/分である。分離段階の量及び時間について所望の生体高分子を効率的に分離することに加え、特に好ましい放射状にひだをとった複合フィルターカートリッジを用いる場合、微粒子がひだをとったフィルター要素の折りたたみを浸透し、したがって、フィルター要素により近づけ、高負荷を容易にできるように、粒子負荷段階の間、相対的に高流動速度が望ましい。一般に固定相微粒子をスラリー化するのに用いられる液体は溶液混合物の溶媒であって、一般に水、好ましくは緩衝水である。疎水的相互作用固定相微粒子では、特に溶離段階では有機

液体を、水と組み合わせて用いることが必要かもしれない。有用な有機液体は50重量%までの量のメタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトニトリル及びN、N-ジメチルホルムアミドを包含する。微粒子は貯槽に、そして最終的にはフィルター要素の上流表面に、フィルターカートリッジ圧が0.15MPaを超えず、好ましくは0.10MPaを超えず、さらに好ましくは0.05MPaを超えないところまで負荷する。十分に負荷された好ましい放射状にひだをとった複合フィルターカートリッジの実際的なフィルターカートリッジ圧の限界は約0.25MPaである。フィルターカートリッジの用途の一般的規則として、約0.05MPa 過剰のフィルターカートリッジ圧に到達した時に、追加の

微粒子のその後の負荷はますます高いフィルターカートリッジ圧を生ずる。しかしながら、特により低い推奨されたフィルターカートリッジ圧を用いると、フィルターカートリッジを通過する溶液の流動速度は大きく、本発明の目的の所望の範囲内のままである。こんな風に、該ユニットはなお、その後の分離及び取り扱い操作の間に出会いそうな偶発の微粒子に対応し得る。実際の操作についていくらかの微粒子負荷能力を残しておくことによって、フィルターが目詰まりによる操業停止を避け、フィルターカートリッジの寿命を延長することができる。

固定相微粒子負荷フィルターカートリッジは、今や、分離フィルター組立体として、通過した溶液混合物から生体高分子を分離するのに用いる準備ができてい

る。分離フィルター組立体及びカートリッジは図1～5に図解されている。複合ろ過媒体を供給するために微粒子を負荷後、貯槽から入口及び出口の配管末端を取り除き（または充填貯槽が分離貯槽としても機能するならば左に取り付けるか）、生物学的混合物を含有する貯槽に取り付ける。生物学的溶液混合物は細胞の成分または生成物である（または、一時的にそうであった）1より多い生体高分子溶液を含み得る。所望の生体高分子は、細胞の外側の膜または壁の溶解後に得られた、細胞または細胞内成分から分泌された生成物であり得る。有用な生物学的溶液混合物は発酵培地、細胞溶解物及び体液、たとえば血液、血液成分、腹水及び尿を包含する。

通常は最短期間で最大量の精製された生体高分子を得るのが望ましい。溶液混

合物が複合ろ過媒体を通過する速度、すなわち、流動速度及び繰返し循環する速度は、本発明の実施のための重要な基準であることが立証された。1つの非常に重要な因子は、本発明の分離フィルター組立体は、主として低圧操作のために、与えられた時

間で大容積の溶液混合物を処理することを可能とする。本発明の分離フィルター組立体の高効率性の原因となる他の因子は、1) 充填カラムで用いられるより大きい粒子に比較して、相対的に大きい表面積及び減少した拡散限界を有するより小さい固定相を用いることができること、2) 高流動速度での生体高分子溶液及び固定相微粒子のより良い剪断混合及び3) 高流動速度でフィルター要素のひだまたは折りたたみに深く含有された多数の微粒子への接近である。少くとも0.10cm/分の溶液混合物通過の流動速度が好ましく、より好ましくは少くとも0.10cm/分で、最も好ましくは少くとも0.30cm/分である。

本発明のフィルター要素は、タンパク質、炭水化物、脂質、核酸及び他の生物学的物質を包含する多くの生物学的分離に有用である。分離精製された生体高分子は有用な治療剤及び診断剤である。

本発明の目的及び利点をさらに次の例により説明するが、これらの例で列挙された特定の物質及びそれらの量、並びに他の条件及び詳細は本発明を不当に制限するものと解すべきではない。

例1

この例は、吸着相互作用を用いて、溶液混合物から生体高分子を分離するのに本発明の分離フィルター組立体を用いることを教示する。

図6に示す分離系を、充填及び分離貯槽として6 lのピーカー、全プロピレン製の公称2ミクロンの孔サイズで水平の放射状にひだをとった複合フィルターカートリッジであって、0.84m²の前面の表面積のろ過層を有する該カートリッジ（型 313B, 3M Filtration Products, セントポール、ミネソタ州から入手可能）及びレキサン（Lexan）フィルターハウジング（型 PSCL, Ametek、シェボイガン、ウイスコンシン州から入手可能）からなる分離フィルター組立

体、マスターフ렉クス (Masterflex) 蠕動ポンプ (型 7549-30, Cole-Parmer Instrument Co., シカゴ、イリノイ州から入手可能) 及びマスターフ렉クス ファームド ノルブレン (Masterflex Pharmed Norprene) 管 (型番号、6485-73、これもCole-Parmer から入手可能) を用いて構築した。

緩衝溶液 (4 l の pH6.5 の 0.005M のリン酸二水素ナトリウム及びリン酸水素二ナトリウム) を貯槽に入れ、ヒドロキシアパタイト (Biogel HTP (商標)、Bio Rad Laboratories、リッチモンド、カリフォルニア州から入手可能) (5 g 増加で60 g) を3800ml/分の流量 (流動速度=0.45cm/分) を用いてフィルターカートリッジの上流表面上に負荷した。分離フィルター組立体的上流側に位置するゲージ圧は、負荷操作の間にほんの0.02MPa の圧力増加を記録した。

分離段階

貯槽中の緩衝液に、予め500ml の緩衝液に溶解した3.25 g のヘモグロビン (ウシ、Sigma Chemical Company、セントルイス、ミズーリ州から入手可能) を添加し、ポンプを3800ml/分で始動させた。5分以内に、UV分析 (408nmで吸収) は、貯槽溶液から95%のヘモグロビンを除去したことを示した。

単離段階

貯槽の内容物を捨て、分離フィルター組立体を4 l の蒸留水を用いて洗浄した (1 回通過)。次に、溶離溶液 (pH6.5で0.25Mリン酸二水素ナトリウム及び0.25 Mのリン酸水素二ナトリウム) (3300ml) を貯槽に入れた。ポンプ輸送を3800ml/分で開始し、UV吸収に基づき、3分で、3300mlの溶液中に81%の結合ヘモグロビンを回収した。

例2

この例は、生体高分子の濃度増加の目的のための異なった分離及

び単離ループを有する分離フィルター組立体の使用と利点の原理を示す。

図5に示された分離フィルター組立体を用い、それはウルトラフィルターシステムズ (Ultrafilter Systems、ブルックリンセンター、ミネソタ州) から得られた。ユニットは全プロピレン製で3 M (型 313B) フィルターカートリッジを特徴とし、分離ループ器具の直径 (内側) は1.50mであるのに対し、単離ループ器

具の直径は0.50cmであった。ヒドロキシアパタイト (60 g) を例1に記載したように同じ緩衝液、量及び流動速度でフィルターカートリッジ上に負荷した。

分離段階

1.5cm の器具及び0.90cm (内径) の管を有する図6に描写された一般的な配置を用いて、流動速度0.45cm/分で、6100mlの全系容積からヘモグロビン (2.00 g) をヒドロキシアパタイトに結合させた。30分後、UV分析は貯槽溶液から95.8%のヘモグロビンが除去されたことを明らかにした。次いで、該ユニットを蒸留水 (4 l) を用いて洗浄した (1 回通過)。

単離及び濃縮段階

分離フィルター組立体に残留している蒸留水を中央出口 (0.50cmの器具) を通って排出させた。次いで、単離ループとして、より小さい一組の器具及び0.50cm (内径) の管を備えたより小さいマスターフ렉クス ポンプ (型 7021-36) を用いて、例1に開示されたように溶離液 (650ml) を3分間カートリッジを通して500ml/分でポンプで繰返し循環させた。続いてポンプ輸送し、該組立体から排出させた時、溶液のUV分析はヘモグロビンの51%の回収を示した。同様に用いられた他の650ml の結合の分離溶液は、さらに19%を除去した。したがって、70%のヘモグロビンが単離され、最初の6100

mlの容積に比較して、1300mlの溶液中により濃縮された形で回収された。

例3

この例は、1よりも多い生体高分子を含有している溶液混合物から、生体高分子を分離するためにイオン交換固定相微粒子を用いることを教示する。pH8で、シトクロムC (pI=9.6) (ウマの心臓、Sigma から入手可能) を陽に荷電させ、それは陽に荷電された、プロトン化されたジエチルアミノエチル (DEAE) ー機能的固定相微粒子に結合しなかった。一方、ウシ血清アルブミン (BSA, pI=5.5) (Miles Diagnostics、カンカギー、イリノイ州から入手可能) を負に荷電させ、それはpH8.0 で結合した。

分離フィルター組立体がフィルターカートリッジ (型 313B, 3M Filtration Products) 及び図5に示されたフィルターカートリッジ ハウジング (Ultra Fil

ter Systems) からなる、図6の分離系を用いた。貯槽は4 lのクエン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)を含有し、DEAEセファロース ファースト フロー (Sepharose Fast Flow (商標)、110~ 160μ当量/ml、Sigma から入手可能) (500ml)を30分にわたって少しずつ3800ml/分 (流動速度=0.45cm/分) でポンプ輸送しながら負荷した。充填期間中、約0.01MPaの対応するフィルターカートリッジ圧が観察された。次いで、EPPS (N-〔2-ヒドロキシエチル〕ピペラジン-N'-〔3-プロパンスルホン酸〕) 緩衝液(pH8.0) (Sigma Chemical Co., セントルイス、ミズーリ州)の溶液 (25mM, 3 l) を分離フィルター組立体にポンプ輸送し(1回通過)、充填クエン酸緩衝液と置換させた。

分離段階

貯槽中の溶液を3850mlの25mM EPPS 緩衝液(pH8.0)で置換した。100mg のシトクロムC (ウマの心臓、Sigma から入手可能)、500m

gのBSA及び40mlのEPPS緩衝液からなる溶液混合物を貯槽に加えて、全分離系容積を5350mlとした(3850ml+40ml+1460ml(分離フィルター組立体及び管の容積))。貯槽中の溶液のUVスペクトルを、280nmの吸収に特別な注意をはらって記録し、それは0.199であった(主にBSAによる)。シトクロムCは408nm(A=0.231)主ピークを示した。ポンプを3000ml/分 (流動速度=0.36cm/分) で從事させ、2分毎に貯槽からアリコートを除去了。280nmの吸収が消えるまでに約20分の繰返し循環ポンプ輸送を要した。408nmの吸収はすべてのアリコート中に本質的に変化せずに残った。したがって、シトクロムCは溶液中に残るのに対し、BSAは分離フィルター組立体中の固定相微粒子上にイオンの結合された。

単離段階

まず、分離フィルター組立体を3 lの25mM EPPS で洗浄した(1回通過)。次いで、同じループ、すなわち、1.5cmの器具を用いて、該ユニットを通して、1M NaClをポンプ輸送した(流動速度=0.36cm/分)(1回通過)。溶離液のUV分析により、最初の3 l中に67%の精製BSAが得られたことが分かった。

例4

この例は、疎水的相互作用結合を用いる、BSA及びシトクロムCの分離を教示

する。

炭化水素ポリマー基体及びペンダントターブチル基を特徴とするマクロブレブ(Macro Prep(商標))ターブチルHIC(商標)支持体 (Bio-Rad Laboratories、ハーキュレス、カリフォルニア州から入手可能)を疎水的相互作用固定相微粒子として用いた。該支持体は50ミクロンの公称ビーズ直径を有するビーズから成り、該物質は20重量%のエタノール-水中のスラリーとして入手でき、該乾燥ポリマー含量は18.6重量%であった。この物質 (40mlのスラリー、7.68g

)を2M硫酸アンモニウムを含有する貯槽に5mlずつ加えた。図6に示された分離系により示されたような形状で用いられたポリプロピレン製フィルターカートリッジ (3M、型 313B)の上流表面上に流量4926ml/分 (流動速度=0.59cm/分)を用い、例1の手順により、微粒子を負荷した。全系の容積は6004mlでpHは5.4であった。シトクロムCと結合した等量のBSAに予備的なUV分析を行なった。280nm/408nmでのシトクロムCについての吸収比は0.148/0.453=0.327であり、BSAと結合すると吸収比 0.179/0.461 =0.388であった。

次に分離系を300mgのシトクロムCと300mgのBSAを用い、タンパク質の固体を貯槽に加え、攪拌することにより、行なってみた。溶解した時、上記流動速度でポンプを始動させ、1mlのアリコートを種々の時間で取り出し、280nm及び408nmでの光学密度を測定した。データを下記表1に示す。

表 1				
時間 (分)	光学密度 (OD) (280nm)	OD (408nm)	280/408 比	
5	0.174	0.466	0.373	
10	0.174	0.460	0.366	
15	0.167	0.460	0.363	
30	0.163	0.456	0.357	
45	0.161	0.452	0.356	
60	0.164	0.455	0.360	

表1は、より極性のシトクロムCは溶液中に残留するのに対し、相対的に疎水

性のBSA(そのpI5.6に近い)は選択的に分離フィルター組立体の固定相微粒子上に結合したことを示す。

この点で、該組立体を2M硫酸アンモニウムで1回通過操作で洗

淨し、すべての非特異的に結合した生体高分子を除去することができる。次いで、BSAを、イオン強度の減少した溶液からなる溶離液、たとえば、0.1M硫酸アンモニウムを、好ましくは同じpHで、該ユニットに流すことにより単離し得る。

例5

この例は親和性相互作用を用いて、多くの生体高分子を含む溶液混合物から特異的な生体高分子を分離するために本発明の分離フィルター組立体を用いることを教示する。

フィルターカートリッジが、公称2 μ mの多孔性の水平の、表面積0.37m²の放射状にひだをとった複合フィルター(3M Filtration Products、セントルイス、ミネソタ州から入手可能)を含んだフィルターカートリッジである、図6の分離系を修正したものを用了。また、並列(in-line)のUV吸収モニター(型UA-5、ISCO Instrument Co. リンカン、ネブラスカ州で入手可能)を分離フィルター組立体の下流側に導入した。0.15M塩化ナトリウム、0.003Mリン酸二水素ナトリウム及び0.017Mリン酸水素ナトリウムからなる緩衝液(41)(pH=7.4)を貯槽に加え、流量4000ml/分(流動速度=1.08cm/分)で該系を繰返し循環させた。すべての取り込まれた空気を除去するためにフィルター組立体を注意深く通氣した。組み換えタンパク質Aを用いて誘導されたEMPHAZE(商標)バイオサポート媒体(Biosupport Media)(80ml、3M Bioapplications、セントポール、ミネソタ州)を20mlのアリコートで充填貯槽に加え、4000ml/分で繰返し循環ポンプ輸送によってフィルターの上流表面に負荷させた。すべてのタンパク質A-機能性固定相微粒子を堆積させた後、該系の流量を粒子がひだの折りたたみ中に堆積したことを確認するために、2分間、6000ml/分に増加させた。次に、系の流量を1000ml/分に減じ、該組立体を61の緩衝液の1回通過で洗淨し

た。この点で、系の流れを停止させ、分離操作を実行するために、充填貯槽、を

磁性攪拌棒を備えた41ポリプロピレン容器と取り替えた。

分離段階

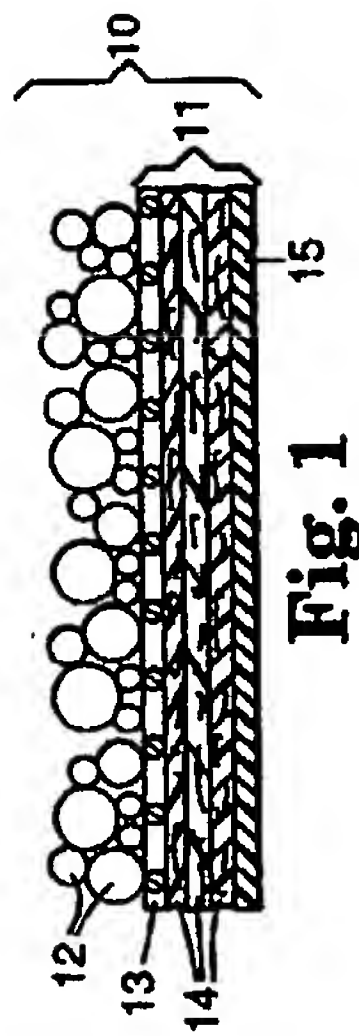
分離貯槽に、すぐ上に記載した緩衝液2000mlを装填し、該系の流量は1000ml/分(流動速度=0.27cm/分)であった。ろ過されたクリオアープアのヒト血漿(350ml、米国赤十字、セントポール地域血液センター、セントポール、ミネソタ州から入手可能)を貯槽に加え、繰返し循環を30分間継続した。次いで、該系を41の新しい緩衝液の1回通過で洗淨した。

単離段階

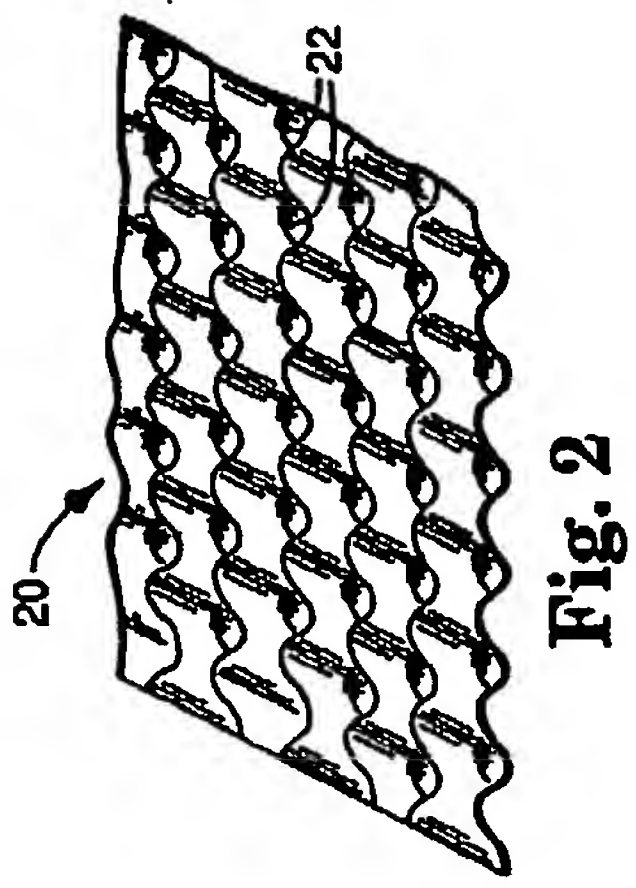
次いで、分離フィルター組立体中に捕獲されたタンパク質を、0.1Mグリシン及び2容量%の酢酸からなる溶液(pH=2.2)(21)を用いて溶離した。この溶液を1000ml/分で15分間、該組立体にポンプで繰返し循環させた。次いで、溶離されたタンパク質を該系をポンプで1回通過させ、全量で4000mlが回収されるまで貯槽に新しい緩衝液を加えることにより単離した。次いで溶出液を分析して、同一性、純度、分離されたタンパク質の濃度を決定した。溶出液の化学的に還元された試料のSDS-ゲル電気泳動(Pharmacia Phast Gel(商標)銀着色を用いる8~25グラジエントゲル)(図7)分析により、溶離されたタンパク質は、真正の商業的な試料との比較により、ほとんど完全に免疫グロブリンからなることが明らかになった。回収された溶出液の280nmの光学密度の測定により、タンパク質の濃度が約0.27g/lであることが明らかになった。したがって、350mlの血漿から約1.08gの純粋なヒト免疫グロブリンを回収した。これは、クリオアープアのヒト血漿中の免疫グロブリンの濃度を10g/lと仮定すると約31%の収率に相当する。

本発明の範囲及び精神からそれることなく本発明の種々の変更及び代替は当業者に明らかであり、本発明は本明細書に記載された実施の態様により不当に限定されないものと理解すべきである。

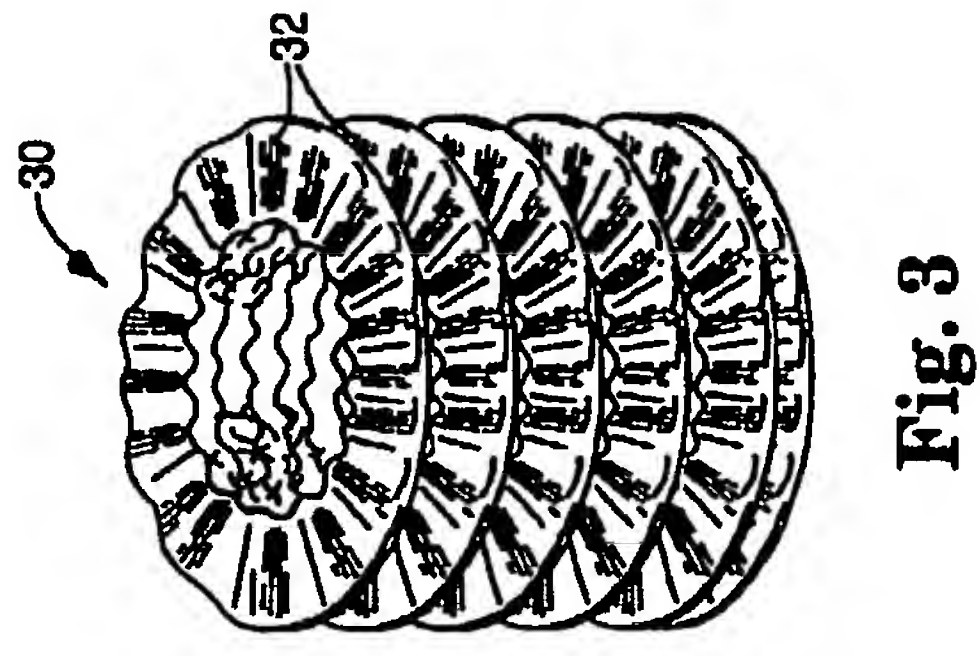
【図 1】



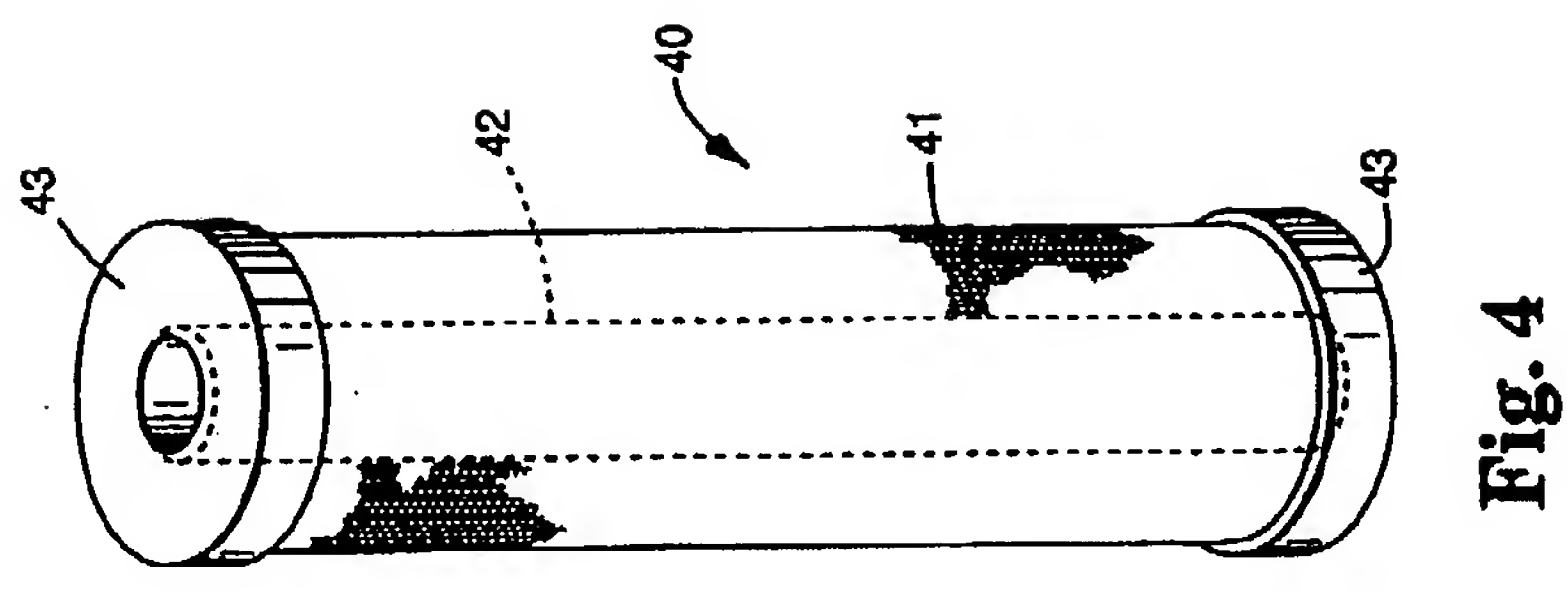
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【図5】

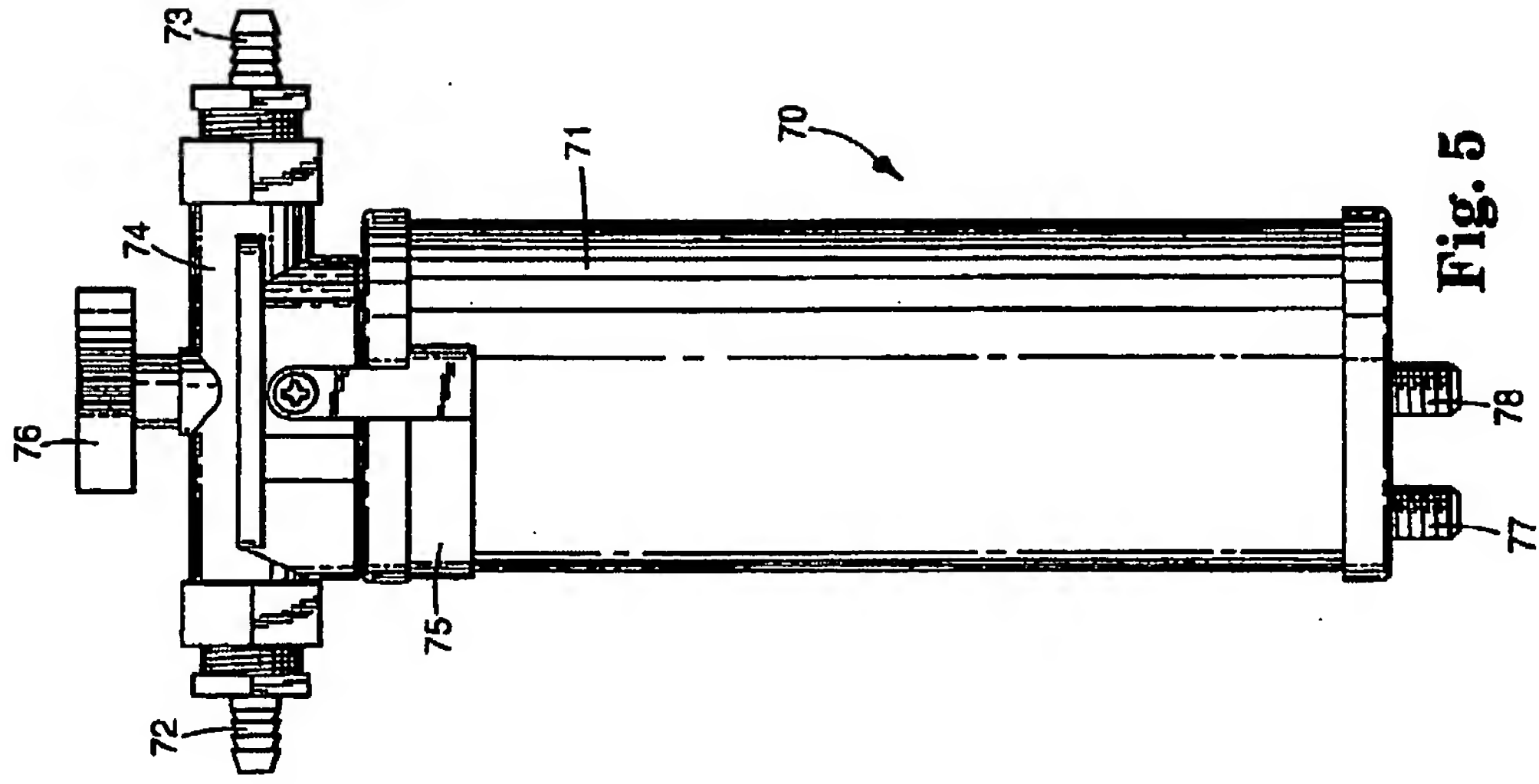


Fig. 5

【図6】

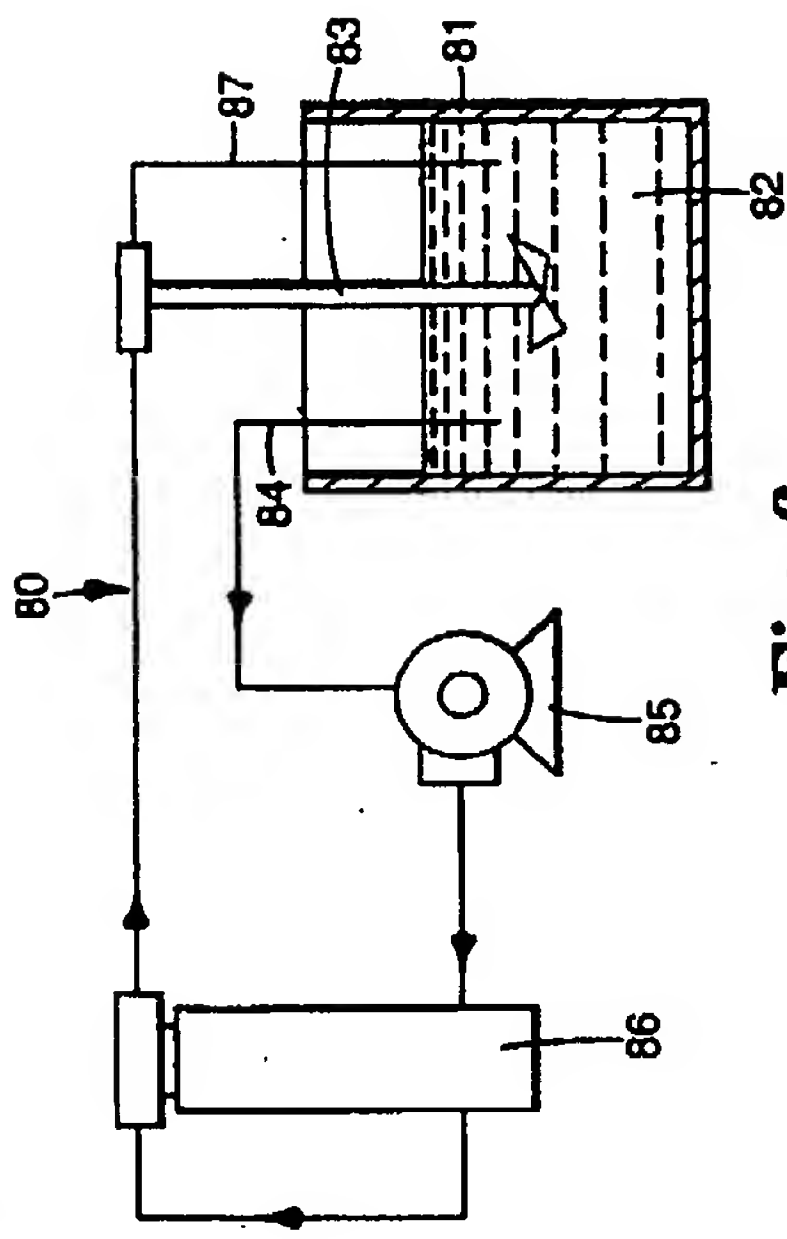


Fig. 6

【図7】

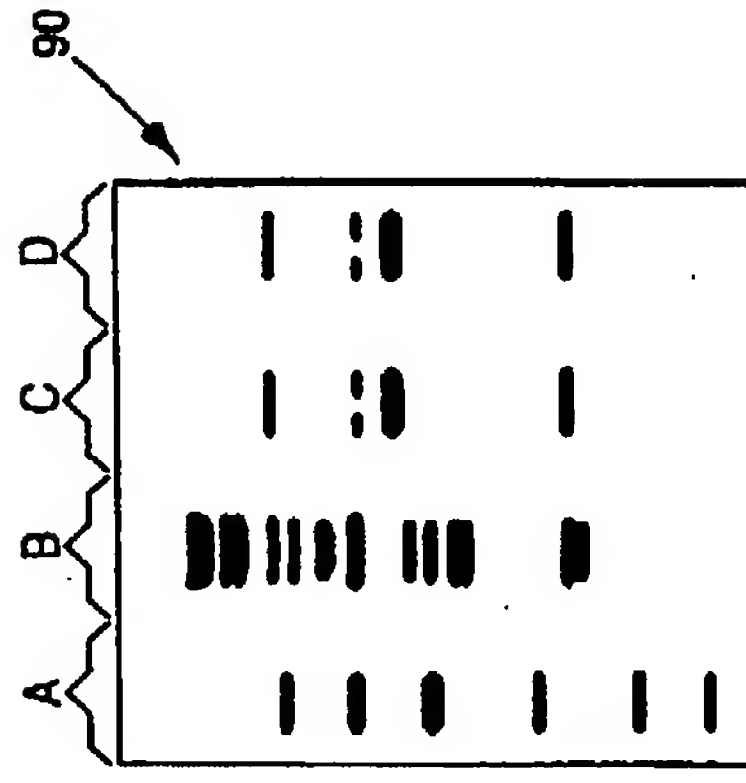


Fig. 7

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1996年1月24日

【補正内容】

請求の範囲

1. 生体高分子を分離する方法であって、
 - a) 生体高分子と結合可能な固定相微粒子がその上流表面上に位置している複合ろ過媒体、溶質として少くとも1つの生体高分子を含む溶液混合物を含有する貯槽並びにポンプ及び閉鎖ループ組立体を形成するための関連する配管を含む閉鎖型フィルターカートリッジを含有してなる分離系を供給する段階、
 - b) 生体高分子ー固定相微粒子生成物を形成させるために、前記少くとも1つの生体高分子が固定相微粒子と結合するように、該溶液混合物を流動速度少くとも0.01cm/分でフィルターカートリッジにポンプで繰返し循環させる段階、
 - c) 任意に、生体高分子ー固定相微粒子生成物を液体で洗浄して、固定相微粒子に結合していない、所望しない生体高分子及び他の溶質を除去する段階、及び
 - d) 任意に、生体高分子を遊離させるために、溶解溶液を生体高分子ー固定相微粒子生成物結合相互作用を逆行可能な閉鎖ループ組立体にポンプで流す段階、を含んでなる前記方法。
2. 前記固定相微粒子が吸着、イオン交換、疎水的結合及び親和性結合による結合可能な微粒子の群から選択される請求項1に記載の方法。
3. 前記溶液混合物を少くとも0.01cm/分の流動速度、最大0.25MPaのフィルターカートリッジ圧で、フィルターカートリッジにポンプで流す、請求項1または2に記載の方法。
4. 前記生体高分子が、タンパク質、炭水化物、脂質、及び核酸よりなる群から選択される請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
5. 前記複合ろ過媒体が、織物または不織布の多孔性物質である

請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

6. 前記ろ過媒体物質が、セルロース、ガラス、ポリオレフィン、ポリエステル、ポリアミド及びセラミックからなる群から選択される請求項1～5のいずれ

か1項に記載の方法。

7. 前記ろ過媒体物質がポリプロピレンである請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

8. 前記吸着固定相微粒子が、ヒドロキシアパタイト、アルミナ、シリカゲル及びジルコニアからなる群から選択される請求項2～6のいずれか1項に記載の方法。

9. 前記微粒子がアフィニティークロマトグラフィー固定相微粒子である請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

10. 前記生体高分子を含有する溶液混合物が、発酵培地、細胞溶解物及び体液からなる群から選択される請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

11. 請求項1～10項のいずれか1項に記載の方法により供給される、生体高分子ー微粒子生成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. and Application No. PCT/US 95/01593	
IPC 6 C07K 801D 39/00 801D 39/00 801D 39/28			
According to International Patent Classification (IPC) as to both technical classification and IPC			
B. FIELD OF INVENTION			
IPC 6 C07K 801D 801J			
Microorganisms described (classification system followed by classification symbols)			
Documents searched other than mentioned documents in the abstract that such documents are included in the fields searched			
Efficient data have been searched during the international search (name of data base used, where practical, search terms used)			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	'Pierce 1989 Handbook & General Catalog' 1989, PIERCE " see page 62, number 20055 "	1-11	
X	'Supelco Chromatography Products (Catalog)' 1994, SUPELCO " see p. 300 and 304: feature "ps" (mesh support) "	1-11	
A	WO, A, 82 00774 (ANF INC.) 18 March 1982 cited in the application " p. 1-22 "	1-11	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the examination of text C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in items.			
* Special categories of cited documents:			
"X" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance			
"Y" earlier document first published on or after the international filing date			
"L" document which may have priority claims or priority claims or which is cited to establish the publication date of another claim or other specific feature (in specific)			
"O" document referred to as an end document, i.e., not cited in the application			
"T" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
Date of the initial completion of the international search		Date of mailing of the international search report	
26 May 1995		21-06-1995	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5011, Frankfurt 2 D-60021 Frankfurt Tel. (+49-69) 940-3000, Telex 31 630 gpe d, Fax (+49-69) 940-3005		Authorized officer Harrison, R	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. and Application No. PCT/US 95/01593			
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8200774	18-03-82	US-A- 4384957	24-05-83
		AU-B- 543079	28-03-85
		AU-A- 7534481	31-03-82
		CA-A- 1161767	07-02-84
		EP-A, 8 0047617	17-03-82
		US-A- 4512897	23-04-85

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	Z
// A 6 1 K 38/00		7433-4C	A 6 1 K 47/48	Z
47/48		8441-4D	B 0 1 D 39/16	A
B 0 1 D 39/16		7433-4C	C 0 8 B 37/00	Z
C 0 8 B 37/00		0271-2J	G 0 1 N 1/10	F
G 0 1 N 1/10		9051-4C	A 6 1 K 37/02	
(72)発明者	ドルティナ、ガリー ジェイ、			
	アメリカ合衆国 ミネソタ、55133-3427、			
	セント ポール、ポスト オフィス ポッ			
	クス 33427 (番地なし)			
(72)発明者	エイツマン、フィリップ デイ、			
	アメリカ合衆国、ミネソタ、55133-3427、			
	セント ポール、ポスト オフィス ポッ			
	クス 33427 (番地なし)			
(72)発明者	ハダッド、ルイス シー、			
	アメリカ合衆国、ミネソタ、55133-3427、			
	セント ポール、ポスト オフィス ポッ			
	クス 33427 (番地なし)			
(72)発明者	ハイド、フレデリック ダブリュ、			
	アメリカ合衆国、ミネソタ、55133-3427、			
	セント ポール、ポスト オフィス ポッ			
	クス 33427 (番地なし)			
(72)発明者	ジョンソン、トッド ダブリュ、			
	アメリカ合衆国、ミネソタ、55133-3427、			
	セント ポール、ポスト オフィス ポッ			
	クス 33427 (番地なし)			
(72)発明者	ラスマッセン、ジェラルド ケー、			
	アメリカ合衆国、ミネソタ、55133-3427、			
	セント ポール、ポスト オフィス ポッ			
	クス 33427 (番地なし)			
(72)発明者	ウイリアム、マイケル ジー、			
	アメリカ合衆国、ミネソタ、55133-3427、			
	セント ポール、ポスト オフィス ポッ			
	クス 33427 (番地なし)			